УДК: 616.993.192.5-07:636.2 (571.1)

**А.П. Красиков, Н.В. Рудаков, Н.П. Бронникова, К.К. Бейсембаев**
*(Институт ветеринарной медицины Омского государственного аграрного университета)*

# УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ АНАПЛАЗМОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Усовершенствованы методы диагностики анаплазмоза крупного рогатого скота: культуральный с использованием культуры клеток Vero и серологический — реакция непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ) для выявления анаплазм в клещах переносчиках на различных стадиях их развития (личинка, нимфа) и в патологическом материале животных, а также антител в сыворотке крови больных животных.

При диагностике больных анаплазмозом животных и анаплазмоносителей некоторые исследователи использовали серологические методы [1, 2], показав практическую ценность и высокую специфичность серологических реакций. Для постановки которых необходимо иметь набор активных специфических антисывороток и антигенов. В связи с этим предложены различные способы их получения [3, 4].

При этом одним из наиболее значимых тестов является реакция непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ).

В задачу первого этапа исследований входило получение диагностической анаплазмозной сыворотки и изучение ее специфичности и активности в РНИФ.

**Материалы и методы**

Для гипериммунизации кроликов использовали 8 суточную культуру полевого штамма A. sp. Omsk, полученную на культуре клеток Vero. Для выделения анаплазм из клеток использовали способ попеременного замораживания (при -20° С – 30 мин) и размораживания при комнатной температуре. После оттаивания клеточную взвесь центрифугировали при 3000 g – 15 мин. Для дальнейшей работы использовали супернатант, который центрифугировали при 6000 g – 60 мин. Полученный осадок трижды отмывали стерильным физиологическим раствором, центрифугируя в том же режиме, и доводили до концентрации 1,7х$10^9$ м. т. в 1 мл по ОСМ ГИСК им. Л.А. Тарасевича. Гипериммунизацию проводили на 3 кроликах породы шиншилла весом 2,5–3 кг по схеме разработанной при микоплазмозе плотоядных животных [5].

Титры антител учитывали на 7, 14, 22 и 30 сутки после введения A. sp. Omsk в РНИФ, антиген для которой готовили из этого же штамма и использовали в концентрации 1 млрд. м.т. после инактивации на водяной бане при 70° С в течение 30 мин.

Из полученной гипериммунной сыворотки готовили ряд последовательных двукратных разведений на физиологическом растворе, начиная с 1:5. РНИФ ставили по общепринятой в люминесцентной

Таблица 1

**Специфичность и активность анаплазмозных: антигена и кроличьей антисыворотки в РНИФ**

| Анти-гены | Анаплазмозная сыворотка | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1/5 | 1/10 | 1/20 | 1/40 | 1/80 | 1/160 | 1/320 |
| A.sp. Omsk | + | + | + | + | + | + | + |
| Микоп-лазмы | + | - | - | - | - | - | - |
| Бруце-ллы | + | - | - | - | - | - | - |
| Хлами-дии | + | - | - | - | - | - | - |
| ИРТ | + | - | - | - | - | - | - |
| Листерии | - | - | - | - | - | - | - |
| Лептоспиры | - | - | - | - | - | - | - |
| Антиген | Сыворотки 1:10 | | | | | | |
| | Анаплаз-мозная | Микоплаз-мозная | Бруцел-лезная | Хлами-диозная | ИРТ | Листери-озная | Лепто-спирозная |
| A.sp. Omsk | + | - | - | - | - | - | - |

Таблица 2

**Определение антигенов возбудителя анаплазмоза в биоматериале от клещей в различных стадиях их развития с помощью РНИФ.**

| Эксперимен-тальные линии клещей | имаго F-I | | личинки F-2 | | нимфы F-2 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | голодные формы | | | | | |
| | Кол-во | Уровень инфици-рованное™, в % | Кол-во | Уровень инфици-рованности, В /а | Кол-во | Уровень инфици-рованности, в % |
| D. reticulatus | 10 | 30+15 | 20 | 40±11 | 20 | 45±11 |
| D. reticulatus | 10 | 50±16 | 20 | 45±11 | 20 | 35±11 |
| D. silvarum | 10 | 40+15 | - | - | - | - |

Примечание: «-». - не исследовали.

микроскопии методике. С обязательными контролями со стандартной отрицательной и положительной сыворотками животных.

### Результаты исследования

Полученная кроличья гипериммунная сыворотка была строго специфична к анаплазмам в разведениях в пределах 1:5-1:320. Вместе.с тем в разведении 1:5 давала перекрестную реакцию с микоплазмами, бруцеллами, хламидиями и вирусами ИРТ (табл. 1). В связи с этим за диагностический титр было взято разведение сыворотки 1:10.

При этом высокий уровень антител регистрировали на 22-30 сутки после начала гипериммунизации, который колебался в пределах 1:160-1:320.

Для обнаружения антигена у экспериментально инфицированных A.sp.Omsk клещевых линий D. reticulatus и D. silvarum (имаго - первого поколения, личинки и нимфы - второго поколения), использовали полученную нами кроличью сыворотку. При этом от каждой экспериментальной линии исследовали по 10 экземпляров имагинальных форм и по 20 экземпляров преимагинальных форм клещей. У первых исследовали гемолимфу, а у вторых — мазки отпечатки из биоматериала. Образцы имаго, личинок и нимф от этих экспериментальных линий исследовали в голодном состоянии. При наличии антигена отмечали интенсивное специфическое свечение.

Результаты исследования экспериментально зараженных клещей D. reticulatus и D. silvarum,в РНИФ показали, что у 30±15% и 50±16% от числа исследованных взрослых особей (имаго) клещей D, reticulatus первого поколения (F-1) были выявлены антигены возбудителя анаплазмоза крупного рогатого скота. В личинках и нимфах второго поколения (F-2) этих же клещей анаплазмы выделяли в 40+11 %, 45±11% и 45+11%, 35+11% случаях соответственно. В клещах D. silvarum (имаго), антиген возбудителя анаплазмоза крупного рогатого скота, был обнаружен в 40±15% случаях (табл. 2).

На следующем этапе исследований была изучена возможность применения РНИФ для диагностики анаплазмоза круп-

Таблица 3

**Изучение ценности РНИФ в сравнении со световой микроскопией при диагностике анаплазмоза крупного рогатого скота в производственных условиях**

| № п/п | Хозяйства | Кол-во | Микроскопия | РНИФ | Совпало | Дополнительно |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | «Колос» | 30 | 20 | 25 | 20 | 5 |
| 2 | «Большевик» | 70 | 60 | 64 | 60 | 4 |
| 3 | «Новороссийское» | 60 | 30 | 40 | 30 | 10 |
| 4 | ОПХ «Боевое» | 60 | 35 | 40 | 35 | 5 |
| 5 | «Такмык» | 20 | 10 | 10 | 10 | - |
| 6 | «Тевриз» | 20 | 20 | 20 | 20 | - |
| 7 | «Колтюгино» | 50 | 40 | 50 | 40 | 10 |
| 8 | «Курносово» | 90 | 60 | 70 | 60 | 10 |
| 9 | «Верхне бельский» | 22 | 22 | 22 | 22 | - |
| 10 | «Горное» | 38 | 36 | 38 | 36 | 2 |
| Всего | | 460 | 333 | 379 | 333 | 46 (14%) |

ного рогатого скота.

Для выявления антител в сыворотки крови больного и подозреваемого в заражении (по положительным результатам микроскопии мазков крови) возбудителем анаплазмоза крупного рогатого скота, использовали антиген, полученный из анаплазм, выращенных на культуре клеток Vero.

При исследовании сыворотки крови 20 коров, спонтанно инфицированных анаплазмами в 100% случаев установлено совпадение положительных результатов световой и люминесцентной микроскопии, что указывает на высокую чувствительность РНИФ. При этом придельное значение среднего титра антител, при котором отмечалось яркое интенсивное свечение в исследованных пробах сыворотки крови инфицированных животных, составило 30±10, что свидетельствует о достаточном уровне активности для анаплазмозного антигена не бактериальной природы.

Диагностическая ценность РНИФ была изучена на 460 головах крупного рогатого скота по выявлению больных анаплазмозом животных в некоторых хозяйствах Омской, Челябинской областей и Республики Башкорстан. Установлено полное совпадение положительных результатов световой микроскопии по обнаружению анаплазм в эритроцитах с показаниями РНИФ. Вместе с тем с помощью люминесцентной микроскопии выявлено на 14% больше больных животных и анаплазмоносителей, чем в световой микроскопии (табл. 3).

Кроме того, РНИФ является технологичным методом и может использоваться одновременно с проведением массовых исследований сыворотки крови на бруцеллез, лейкоз и другие инфекционные болезни.

Таким образом, экспериментальные исследования и результаты производственных испытаний показали, возможность применения РНИФ для обнаружения антител в сыворотке крови инфицированных и подозреваемых в заражении анаплазмозом крупного рогатого скота. РНИФ также является эффективным диагностическим тестом для обнаружения возбудителя анаплазмоза крупного рогатого скота в биоматериале клещей, выявляя при этом до 45±11–50±16% зараженных особей.

Кроме того, выявление возбудителя анаплазмоза крупного рогатого скота в гемолимфе половозрелых клещей (гемолимфо-тест), позволяет предположить о персистенции возбудителя во всех органах и тканях клеща. При этом гемолимфо-тест, является легким, наиболее доступным и достоверным методом исследования клещей-переносчиков на анаплазмоносительство.

**Выводы**

1. Получены специфичные антигены и активные в РНИФ (1:320) кроличьи сыворотки для выявления анаплазм в биоматериале клещей переносчиков инфекции, и антител в сыворотке крови крупного рогатого скота, больного анаплазмозом.
2. Полученную сыворотку можно использовать в РНИФ для индикации и идентификации возбудителя анаплазмоза крупного рогатого скота, изучения его антигенных свойств и родства, а также патогенеза болезни.
3. В производственных условиях установлена высокая диагностическая ценность РНИФ. С помощью, которой дополнительно к световой микроскопии выявлено 14% больных животных и анаплазмоносителей.

**SUMMARY**

**1. Specific antigens as well as IIFR-active rabbit sera (1:320) used For detecting anaplasma in biomaterial of tick-transmitters and antibodies in serum of cattle, infected with anaplasmosis, have been received.**

**2. Obtained serum can be used as indicator and identificator of bovine anaplasmosis causative agent in IIFR and for studding antigenic and relative properties of bovine anaplasmosis causative agent and disease pathogenesis.**

**3. High diagnostic value of IIFR was confirmed practically. Using this method (in combination with light mycroscoping) 14% infected animals as well as anaplasmosis –carriers have been detected.**

Литература

1. Ristic M. Capillary tube – agglutination test for anaplasmosis // I. Am. Vet. Med. Ass. 1962. V. 141, №5.
2. Kuttler K. Comparison of complement fixation and capillary tube agglutination tests for delection of bovine anaplasmosis // I. Am. Vet. Med. Ass. 1963. V. 143, №7.
3. Schindler R. Vergleichende Untersuchungen mit Anaplasma marginale and Anaplasma centrale // I. Tropenmed. Parasitol. 1966. B. 17. S. 337–360.
4. Степанова Н. И. Методы приготовления антигенов для диагностики кровепаразитарных болезней и изучения иммунологического состояния организма больных и переболевших животных: тр. ВИЭВ М., 1970. Т. 38. С. 90–95.
5. Красиков А.П., Новикова Н.Н., Рудаков Н.В. Актуальные аспекты лабораторной диагностики урогенитальных микоплазмозов мелких домашних животных // Актуальные проблемы ветеринарной медицины в современных условиях и пути их разрешения / Сб. научн. работ Омского ветеринарного института. Омск. 2000. С. 130–132.